

# VARIABILIDAD DE POBLACIONES DE *Brassica napus* ESPAÑOLAS E INGLESAS DETERMINADA POR MARCADORES RAPDs

M.E. CARTEA, G. PADILLA, P. SOENGAS, Y A. ORDÁS

Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),  
Apartado 28, E-36080 Pontevedra

## Abstract

The genetic diversity and the relationships among a collection of *Brassica napus* L. European populations were evaluated using random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers. The study included 33 accessions collected from Galicia (northwestern Spain) and 18 British cultivars. DNA from twenty-five individuals per population was analyzed using 18 decamer primers. One hundred thirty-eight amplification products were scored of which 105 were polymorphic. Eight groups were obtained. Cluster I was the largest and included all the landraces from northwestern Spain, except two accessions that grouped separately into clusters III and IV, respectively. A low level of genetic variability was detected among the Spanish genotypes, while considerable diversity was present among the British ones, which grouped into five groups. Cluster II included all commercial varieties grown in Great Britain whereas Cluster V grouped local varieties maintained by growers for many years. Cluster VI, VII, and VIII were singularities formed by one entry. Two British accessions had the greatest dissimilitud with all the other populations. As conclusion, *B. napus* landraces used in northwestern Spain as leafy-green vegetable probably have an independent origin from *B. napus* crops grown in other European regions. Besides, separate domestication in northwestern Spain and Great Britain for a different end use might have led to two distinct gene pools.

Key words: *Brassica napus*, genetic diversity, molecular markers, numerical taxonomy.

## Resumen

El objetivo de este trabajo es evaluar la diversidad genética y las relaciones entre 33 poblaciones gallegas y 18 poblaciones inglesas de *Brassica napus* L. mediante RAPDs. Se encontraron 138 bandas RAPDs de las cuales 105 fueron polimórficas. Las 51 poblaciones se agruparon en ocho grupos. El grupo I fue el mayor e incluyó todas las poblaciones locales del Noroeste de España, excepto dos entradas que se agruparon solas en los grupos III y IV, respectivamente. Se encontró un bajo nivel de variabilidad genética entre las poblaciones españolas mientras que entre las inglesas se halló una considerable diversidad. El grupo II incluyó todas las variedades comerciales cultivadas en Gran Bretaña mientras que el grupo V agrupó variedades locales mantenidas tradicionalmente por los

agricultores. Los grupos VI, VII, y VIII estuvieron formados por una sola población. Las variedades locales de *B. napus* utilizadas en Galicia tienen probablemente un origen independiente de las formas de *B. napus* cultivadas en otras regiones de Europa. La domesticación independiente en el Noroeste de España y en Gran Bretaña para diferentes usos podría haber conducido a una divergencia genética entre los dos grupos.

Palabras clave: *Brassica napus*, diversidad genética, marcadores moleculares, taxonomía numérica.

## 1. Introducción

En la recolección de variedades del género *Brassica* realizada por la Misión Biológica de Galicia en los años 80 (Ordás y Baladrón, 1985) apareció en la zona de las Rías Bajas gallegas un nuevo cultivo hortícola llamado nabicol, descrito previamente por Gallástegui (1926) como un tetraploide de *Brassica oleracea* L. o *Brassica juncea* L. Estudios posteriores basados en aspectos citológicos (Ordás y Baladrón, 1985) y análisis isoenzimáticos (Arús *et al.*, 1987) identificaron este cultivo como *B. napus* var. *pabularia*. En esta región los agricultores realizan una economía rural de subsistencia y minifundio, manteniendo las variedades locales para su autoconsumo. El nabicol se consume por sus hojas en la alimentación humana como una hortaliza en fresco, tras un proceso de cocción.

En otros países europeos como Gran Bretaña, los cultivos de *B. napus* var. *pabularia* tienen gran importancia por su doble aprovechamiento, hortícola y forrajero. En este país, el Horticultural Research Institute (HRI), en Wellesbourne, Warwick, mantiene un importante número de accesiones de esta especie, incluyendo variedades locales y comerciales con diferentes usos finales. En un trabajo previo se evaluó morfológicamente una colección de variedades de nabicol gallegas e inglesas, observándose que fenotípicamente eran diferentes. No obstante, la expresión de los caracteres morfológicos y en especial de los cuantitativos está influenciada por el ambiente y por la presión selectiva durante el proceso de domesticación y mejora haciendo más complicada la identificación de los cultivares. Los marcadores moleculares, incluyendo los RAPDs permiten la caracterización de genotipos y el estudio de las relaciones genéticas de un modo más preciso. Los marcadores RAPDs han sido ampliamente utilizados para la identificación de cultivares en varias especies de brassicas (Hu y Quirós, 1991; Mailer *et al.*, 1994; Cassian y Echeverrigaray, 2000), para determinar las relaciones genéticas entre especies relacionadas (Demeke *et al.*, 1992; Ren *et al.*, 1995) y para estimar la diversidad genética y las relaciones entre colecciones de germoplasma de brassicas (Kresovich *et al.*, 1992; Farnham, 1996; Divaret *et al.*, 1999). Sin embargo, no se han realizado estudios hasta la fecha acerca de la caracterización molecular del germoplasma de *B. napus* actualmente cultivado en Galicia. Por lo tanto, se conoce muy poco acerca de su origen y diversidad genética así como de su relación con otros cultivos de *B. napus* de otros orígenes, utilizados también por sus hojas. El objetivo de este trabajo es estudiar la variabilidad genética

de las variedades de *B. napus* del Noroeste de España y de Gran Bretaña y determinar las relaciones entre ellas basadas en los datos de marcadores RAPDs.

## 2. Material y Métodos

La extracción de ADN se realizó sobre hojas jóvenes de 51 poblaciones locales y variedades comerciales de *B. napus* siguiendo el método de Liu y Whittier (1994). De ellas, 33 muestras proceden de la colección de germoplasma de la Misión Biológica de Galicia, en Pontevedra y 18 variedades proceden de la colección de germoplasma mantenida en el HRI en Gran Bretaña. Para ello se sembraron 40 semillas de cada población y se extrajo el ADN de 25 plántulas. Se realizaron cinco muestras por población tomando cinco plántulas por muestra. Para la amplificación se usaron inicialmente 120 cebadores decaméricos (Operon ADN Technologies Inc, Alameda, California; Kits A, B, C, D, E y F). Se seleccionaron 18 de ellos en función del número e intensidad de las bandas que proporcionaban. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl de una solución 3,0 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP's, 30 ng de cada cebador, 1 unidad de enzima Taq ADN-polimerasa (ECOGEN, S.R.L.) en el tampón suministrado por el fabricante con 25 ng de ADN molde. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *MJ Research Programmable Thermal Controller (PTC-100)*. El programa utilizado fue: un paso inicial de 5 min a 94 °C, 45 ciclos de 1 min a 94 °C y 1 min a 35 °C seguidos de 2 min a 72 °C para la extensión final. Se incluyó un control negativo en todas las reacciones las cuales se realizaron al menos dos veces para comprobar la repetibilidad. Los resultados de la amplificación se separaron en geles de agarosa al 1,5% y se visualizaron y fotografiaron bajo radiación ultravioleta tras ser teñidos con bromuro de etidio. Cada banda obtenida se nombró con el número del cebador seguido del tamaño aproximado en pares de bases y se elaboró una matriz de datos compuesta por los valores 1 y 0 que indicaban respectivamente presencia/ausencia de bandas. Se calculó el coeficiente de similitud de Dice conocido como el coeficiente de Nei y Li (1979) usando la aplicación NTSYS-PC versión 2,02 (Rohlf, 1998). Se realizó el análisis de grupos basado en el método UPGMA y se elaboró un dendograma.

## 3. Resultados y Discusión

De los 120 cebadores iniciales se seleccionaron 18 que permitieron obtener productos de amplificación polimórficos, nítidos y repetibles, los cuales se usaron para el estudio de la variabilidad de las poblaciones. Con los 18 cebadores seleccionados se obtuvieron un total de 138 bandas de las cuales 105 fueron polimórficas (76%). Este porcentaje es similar al observado por Hu y Quirós (1991), Kresovich *et al.* (1992) y Farnham, (1996) aunque relativamente mayor al encontrado por Mailer *et al.* (1994) y Cansian y Echeverrigaray (2000). El número promedio de bandas por cebador fue de ocho, siendo el tamaño de las mismas variable entre 350 y 2500 pb lo cual está dentro del rango publicado en otros estudios de *Brassica* (Kresovich *et al.*, 1992; Mailer *et al.*, 1994; Farnham, 1996; Rabbani *et al.*, 1998; Cansian y Echeverrigaray, 2000). Los resultados muestran que los marcadores RAPDs han sido capaces de detectar variabilidad entre las

distintas accesiones y evaluar las relaciones genéticas entre ellos. Diez poblaciones (MBG-BRS0014, MBG-BRS0037, MBG-BRS0039, MBG-BRS0134, 006478, 005690, 005691, 005678, 003257 y 005687) se caracterizaron por la presencia o ausencia de una única banda que las demás accesiones no presentaban.

Las 51 poblaciones se agruparon en tres grupos principales y cinco grupos singulares con solo una entrada basándose en la distancia de Nei y Li (Figura 1). Los índices de similitud variaron entre 0,77 y 0,88 los cuales son similares a los encontrados entre variedades de repollo (Kresovich *et al.*, 1992; Cansian y Echeverrigaray, 2000) o coles (Farnham, 1996). Sin embargo, el valor de 0,88 es elevado si se compara con los obtenidos por Mailer *et al.* (1994) entre variedades de colza. Las 33 poblaciones españolas estuvieron muy relacionadas entre sí y se agruparon en tres grupos: grupo I, III y IV. El grupo I fue el mayor e incluyó todas las poblaciones españolas, excepto MBG-BRS0039 y MBG-BRS0014, las cuales se agruparon independientemente en los grupos III y IV, respectivamente. Estas poblaciones representan variedades locales mantenidas tradicionalmente por los agricultores en Galicia los cuales han realizado selección masal para su uso como hortalizas de hoja. Esta selección podría haber sido reforzada por la selección natural ya que estos cultivos crecen normalmente en zonas templadas del valle del río Miño. El grupo más numeroso (grupo I) se dividió en dos subgrupos, grupo I-1 (precoces) y grupo I-2 (tardías), sugiriendo que el germoplasma español se clasificó según su precocidad.

El germoplasma inglés mostró mayor variabilidad que las variedades gallegas agrupándose en dos grupos principales y tres grupos formados por solo una entrada. El grupo II incluyó cinco variedades comerciales (003257, 003258, 003259, 003308, y 003333) utilizadas como forrajeras. El grupo V incluyó 10 poblaciones locales cultivadas en Gran Bretaña bajo el nombre de "rape kale". Tres accesiones: 005691, 005687 y 006478 formaron grupos aislados (grupos VI, VII, y VIII, respectivamente). La población 006478 es una variedad comercial seleccionada como forrajera mientras que la accesión 005687 es una variedad local mantenida por selección masal por los agricultores. Las poblaciones 005673, 005674, 005678, 005680 y 005681 fueron recolectadas directamente de los agricultores. Si se comparan algunas características morfológicas y los grupos obtenidos, pueden observarse algunas coincidencias. Así por ejemplo, las variedades 005680, 005681 y 005690 que se agruparon cerca, mostraron similares características foliares, completamente diferentes al resto de las variedades evaluadas. La mayor similitud (0,98) se encontró entre 005680 y 005681.

Este estudio indica que existe una baja variabilidad dentro de las variedades gallegas, si bien se han observado diferencias entre el germoplasma gallego y el europeo. Las variedades gallegas (grupo I) estuvieron más relacionadas con las variedades comerciales utilizadas en Gran Bretaña (grupo II) que con las locales, debido probablemente a la selección de características de la planta similares en cada país. El bajo grado de variabilidad genética encontrada dentro del germoplasma de *B. napus* recolectado en Galicia podría deberse a la proximidad geográfica de las variedades o a un origen genético común. Además, la adaptación

a las condiciones locales y la selección para caracteres similares realizada por los agricultores en el sur de la costa Atlántica así como los desplazamientos humanos en la región podrían haber contribuido a esa baja diversidad. La mayor variabilidad dentro del germoplasma inglés podría reflejar diferencias en el grado de domesticación y mejora de estos cultivos ya que las entradas inglesas se separaron claramente en variedades comerciales y variedades locales.

Los marcadores RAPDs han resultado ser válidos para determinar las relaciones dentro del germoplasma de *B. napus*. El agrupamiento de las variedades del mismo origen geográfico ayuda a confirmar la validez de esta técnica. La relación observada entre los grupos y el origen geográfico de las muestras no coincide con otros estudios en colza (Mailer *et al.*, 1994), mostaza (Rabbani *et al.*, 1998) y col china (Ren *et al.*, 1995).

#### 4. Conclusiones

*Brassica napus* podría haberse originado fuera de la región Mediterránea (Gómez-Campo y Prakash, 1999), donde sus parentales, *B. oleracea* y *B. rapa*, habrían evolucionado conjuntamente. La domesticación independiente en el Noroeste de España y en Gran Bretaña debido a diferentes usos finales del cultivo podría haber conducido a dos grupos génicos distintos. En consecuencia, no se ha podido comprobar la hipótesis de que el nabicol sea alguna variedad trasladada a Galicia; sin embargo, es posible que tenga un origen local. Puede ser, por consiguiente, un cultivo prometedor en un programa de mejora al constituir un nuevo cultivo dentro de las plantas hortícolas.

#### Agradecimientos

Investigación financiada por la Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, España.

P. Soengas agradece la beca de La Xunta de Galicia y G. Padilla agradece la beca del Cabildo Insular de la Palma.

#### Referencias

- Arús, P., Baladrón, J.J. y Ordás, A. 1987. Species identification of cultivated brassicas with isozyme electrophoresis. *Crucifer. Newsl.* 12: 26-27.
- Cansian, R.L. y Echeverrigaray, S. 2000. Discrimination among cultivars of cabbage using random amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* 35: 1155-1158.
- Demeke, T., Adams, R.P. y Chibbar, R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 990-994.

- Divaret, I., Margalé, E. y Thomas, G. 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1029-1035.
- Farnham, M.W. 1996. Genetic variation among and within United States collard cultivars and landraces as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 374-379.
- Gallástegui, C. 1926. Número de cromosomas en algunas especies del género *Brassica*. *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.* 26: 185-191.
- Gómez-Campo, C. y Prakash, S. 1999. Origin and domestication, p. 33-58. En: C. Gómez-Campo (ed.). *Biology of Brassica Coenospecies*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Hu, J. y Quirós, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505-511.
- Kresovich, S., Williams, J.G.K., McFerson, J.R., Routman, E.J. y Schaal, B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: 190-196.
- Liu, Y. y Whittier, R.F. 1994. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads. *Nucleic Acid Research* 22: 2168-2169.
- Mailer, R.J., Searth, R. y Fristensky, B.. 1994. Discrimination among cultivars of rapessed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87:697-704.
- Nei, M. y Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Ordás, A. y Baladrón, J.J. 1985. Collecting of brassicas in northwestern Spain. *Crucifer. Newsl.* 10: 14.
- Rabbani, M.A., Iwabuchi, A., Murakami, Y., Suzuki, T. y Takayanagi, K. 1998. Genetic diversity in mustard (*Brassica juncea* L.) germplasm from Pakistan as determined by RAPDs. *Euphytica* 103: 235-242.
- Ren, J., McFerson, J.R., Kresovich, S. y Lamboy, W.F. 1995. Identities and relationships among Chinese vegetable brassicas as determined by random amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 548-555.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02e. EXETER software, Setauket, New York.